

**Preditores de mortalidade total e eventos arrítmicos graves
em insuficiência cardíaca de etiologia não-isquêmica: o papel
da galectina-3**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
ADRIANO NUNES KOCHI

Orientador:
Prof. Dr. Luís Eduardo Paim Rohde

DEDICATÓRIA

Aos mestres que me guiaram no conhecimento em cardiologia Maurício Pimentel,

Leandro Zimmerman e Luís Eduardo Rohde.

À minha amada noiva Ana Paula que me fez crescer como médico ser humano.

AGRADECIMENTOS

Ao meu fiel ajudante neste projeto Tiago Zimerman.

Ao Dr. Anderson Donelli da Silveira e a equipe da Unidade de Métodos Não-Invasivos, pela presteza e qualidade nos testes cardiopulmonares de esforço.

À equipe do ambulatório de insuficiência cardíaca, pela parceria no cuidado aos pacientes e na minha caminhada pelo mundo acadêmico.

Ao Dr. Michael Andrades pela disponibilização do CardioLab e ao Santiago Tobar pela indispensável ajuda no processamento das amostras de sangue.

Aos Drs. Felipe Soares Torres e Murilo Foppa, por tantas ressonâncias magnéticas e pela disponibilidade na discussão de casos e resolução de dúvidas.

À equipe da Eletrofisiologia (Prof^o Leandro Zimerman, Dr. Maurício Pimentel e Dra. Ana Paula Magalhães) por tudo que aprendi nesses 2 anos de imersão.

À equipe de Cirurgia Cardiovascular por todo o aprendizado em estimulação cardíaca artificial, equipe do Prof^o Orlando Wender e do Prof^o Eduardo Saadi.

SUMÁRIO

1. Artigo de Revisão – Marco Teórico	5
2. Justificativa de Pesquisa	22
3. Hipóteses.....	23
4. Objetivos.....	24
5. Artigo Original em Inglês.....	26

ARTIGO DE REVISÃO – MARCO TEÓRICO

Título

Fibrose miocárdica como preditor de eventos arrítmicos em miocardiopatias

Título em Inglês

Myocardial fibrosis as predictor of arrhythmic events in cardiomyopathies

Autores: Adriano Kochi MD, Mauricio Pimentel MD ScD, Michael Andrades PhD,
Leandro Zimmerman MD ScD, Luis E. Rohde MD ScD

Palavras-chave: morte súbita, miocardiopatia, risco, arritmia

Keywords: sudden death, cardiomyopathy, risk, arrhythmia

Resumo

A prevalência e a incidência de insuficiência cardíaca (IC) revelam um grave problema de saúde pública, responsável por um grande número de internações, altos custos com tratamento e elevada taxa de mortalidade. Aproximadamente 30% dos óbitos é por morte súbita, sendo esta definida como morte inesperada, por causas cardíacas, que ocorre geralmente em até 1 hora do início dos sintomas. Apesar dos avanços no tratamento farmacológico, na terapêutica com implante de cardiodesfibrilador (CDI) e nos dispositivos mecânicos, a IC mantém uma significativa taxa de eventos. A fibrose miocárdica, definida como formação anômala intramiocárdica de tecido conjuntivo causando distorção da arquitetura e disfunção cardíaca, é uma entidade quase que onipresente no contexto de diferentes miocardiopatias. Sua avaliação no cenário clínico tem sido testada há vários anos por diferentes métodos, desde a biópsia endomiocárdica, reconhecidamente invasiva e com riscos não negligenciáveis, até sofisticados métodos de imagem ou marcadores miocárdicos do metabolismo do colágeno. Estudos de coorte com avaliação de fibrose em diferentes contextos têm demonstrado importante associação com arritmias cardíacas. A prevenção de morte súbita é parte importante do tratamento da IC que passa por tratamento farmacológico otimizado e implante de CDI, dispositivo de alto custo frente a realidade financeira brasileira. Frente a dúvida referente ao benefício do CDI na IC de etiologia não-isquêmica lançada por recentes ensaios clínicos e a dificuldade orçamentária para uso irrestrito do CDI, realidade de muitos países em desenvolvimento, faz-se necessário a determinação do perfil de paciente com maior risco de arritmias ventriculares, ou seja, de maior benefício com seu implante. Neste trabalho é apresentado uma revisão sobre a relação da fibrose, avaliada por diferentes métodos não-invasivos, com eventos arrítmicos.

Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome de considerável prevalência, podendo ser considerada um problema de saúde pública. Nos Estados Unidos 5 milhões de pessoas tem diagnóstico de IC, com uma incidência de aproximadamente 10 indivíduos por 1000 naqueles com mais de 65 anos e mortalidade que pode chegar a 50% nos primeiros 4 anos¹. Dados do município de São Paulo apontam para elevado número de internações, gerando alto custo com tratamento e mortalidade próxima a 15%². Os óbitos relacionados a IC de maneira geral ocorrem por progressão da doença com evolução para choque cardiogênico ou por arritmias determinando morte súbita (MS). MS é definida como óbito que ocorre em até 1 hora do início dos sintomas, sendo responsável por até 30% dos óbitos neste contexto^{3,4}.

A fibrose, parte inseparável do processo de regeneração tecidual está, em diferentes magnitudes, onipresente no miocárdio dos pacientes com diferentes miocardiopatias. Do ponto de vista fisiopatológico a ocorrência de insuficiência cardíaca encontra-se intimamente ligada a resposta ao dano celular miocitário com ativação de cascata inflamatória determinando, entre outros, reformulação de matriz extracelular, com degradação e síntese de novos componentes. Entre as consequências desta alteração estrutural está a modificação na ativação elétrica cardíaca, criando áreas de bloqueio de condução e condução lentificada por destruição das *gap junctions* entre as células⁵. Diversos trabalhos tem apontado de maneira homogênea que tanto a quantidade quando o padrão de fibrose tem associação independente com o risco de arritmias cardíacas em diferentes contextos^{6,7}. A determinação da presença de fibrose, que tem o como seu padrão-ouro a avaliação histológica direta, atualmente pode ser feita por métodos de imagem ou mesmo marcadores séricos validados. Em sendo um fator de risco para arritmias, a pesquisa de fibrose pode ter papel importante na estratificação de risco, especialmente em cenários de indefinição de tratamentos com potencial de salvar vidas, como o implante de CDI em IC não-isquêmica, entre outros.

Fibrose Miocárdica

Fibrose é a formação excessiva de tecido conjuntivo com potencial de alterar a arquitetura e a função de órgão ou tecido, que habitualmente ocorre em resposta a um insulto inflamatório. A fibrose miocárdica (FM) é, mais frequentemente, relacionada ao

dano isquêmico, embora pode ser encontrada em uma variedade de condições determinantes da insuficiência cardíaca não-isquêmica (ICNI)⁸. O acúmulo de colágeno é resultante de um desequilíbrio da sua síntese em relação à degradação. Embora a biópsia endomiocárdica (BEM) seja o padrão-ouro de avaliação da FM, seus riscos e a dificuldade em obter amostra da exata área acometida, motivaram a busca por métodos não invasivos de avaliação. De forma pragmática, eles podem ser divididos em métodos de imagem e marcadores séricos.

Métodos de Imagem na Detecção de Fibrose Miocárdica

Ecocardiografia

A reflexão acústica, geradora de imagem no ecocardiograma, é influenciada pela composição tecidual miocárdica. A refletividade do tecido na imagem de ultra-som tem sido utilizada para a caracterização de fibrose por várias décadas. Neste contexto, características como a acinesia e hiperrefringência podem ser utilizadas para quantificar FM, já validada em condições como a miocardiopatia hipertrófica (MCH) e cardiopatia hipertensiva⁹. Em estudo de Baumgartner e cols., o ecocardiograma de estresse mostrou-se superior à tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) no que diz respeito à determinação de viabilidade em segmentos acinéticos¹⁰. O *strain* miocárdico avalia o grau de deformação da fibra muscular durante o ciclo cardíaco, podendo ser avaliado por Doppler tecidual ou *speckle tracking*. Gjesdal e cols. e Roes e cols. publicaram dados que demonstraram alta sensibilidade e especificidade dos escores de *strain* longitudinal na predição da extensão de cicatriz miocárdica em pacientes com miocardiopatia isquêmica quando comparado ao realce tardio avaliado por ressonância magnética cardíaca (LGE-CMR)^{11,12}.

Imagem Nuclear

A imagem nuclear cardíaca pode ser feita basicamente por 2 métodos: tomografia por emissão de pósitrons (PET) ou cortes tomográficos por emissão de fótons (SPECT), ambos validados para avaliação de cicatriz e viabilidade miocárdica. Os princípios básicos da PET são semelhantes aos do SPECT. Ambos métodos geram imagens pela leitura da concentração de radioisótopos no miocárdio viável (via gama câmera

externa). Os sistemas de PET são, no entanto, mais sensíveis que os SPECT devido à melhor resolução espacial e correção de atenuação mais precisa¹³.

O índice de perfusão tecidual da água recentemente emergiu como método de detecção in vivo de fibrose miocárdica por PET, usando os traçadores H₂O₁₅ e C₁₅O. Em indivíduos normais, o índice deve ser 1, em tecido fibrótico, pela incapacidade de trocar água rapidamente, o índice diminui. Estudos que compararam a PET com a LGE-CMR mostraram uma correlação negativa moderada a alta e estatisticamente significativa ($r = -0,65$). Quando LGE-CRM detecta extensa fibrose a PET costuma subestimar a extensão.

Apesar do uso frequente do SPECT para avaliação da viabilidade miocárdica, um estudo realizado por Wagner e cols. comparou LGE-CMR com SPECT em modelo canino de lesão miocárdica. Neste estudo a LGE-CMR identificou 92% de todos os infartos subendocárdicos, enquanto o SPECT identificou apenas 28%¹⁴.

Ressonância Magnética Cardíaca

A possibilidade de uma avaliação mais precisa da FM transformou a CMR em um método amplamente empregado. Um estudo inicial, publicado por Kim e cols., avaliou a LGE-CMR em cães submetidos a infarto do miocárdio irreversível (IAM) e à isquemia reversível induzida por oclusão transitória por de balão coronário. Foi observado maior extensão de realce tardio por gadolínio (LGE, *late gadolinium enhancement*) naqueles com IAM comparado com os submetidos à isquemia reversível. Os cães foram sacrificados e tiveram seus corações submetidos a exame anatomopatológico (AP). Descobriram, então, que a extensão do LGE era essencialmente a mesma que a extensão da necrose determinada por AP em ambos grupos nos animais sacrificados no 1º dia ($R = 0,99$; $p = 0,001$), no 3º dia ($R = 0,99$; $p = 0,001$) e após 8 semanas ($R = 0,97$; $p = 0,001$)¹⁵. Apesar de considerada segura, está contraindicada em pacientes com perda de função renal significativa (depuração de creatinina endógena <30 ml/min/m²) e em portadores de determinadas próteses, além de limitado em claustrofóbicos. A CMR fornece informação sobre a extensão, topografia e padrão de distribuição da cicatriz, podendo também fornecer pistas sobre o diagnóstico etiológico. O rápido avanço tecnológico na avaliação do LGE está expandindo seu uso, sendo atualmente possível visualização de fibrose na parede livre do ventrículo direito e nos átrios¹⁶.

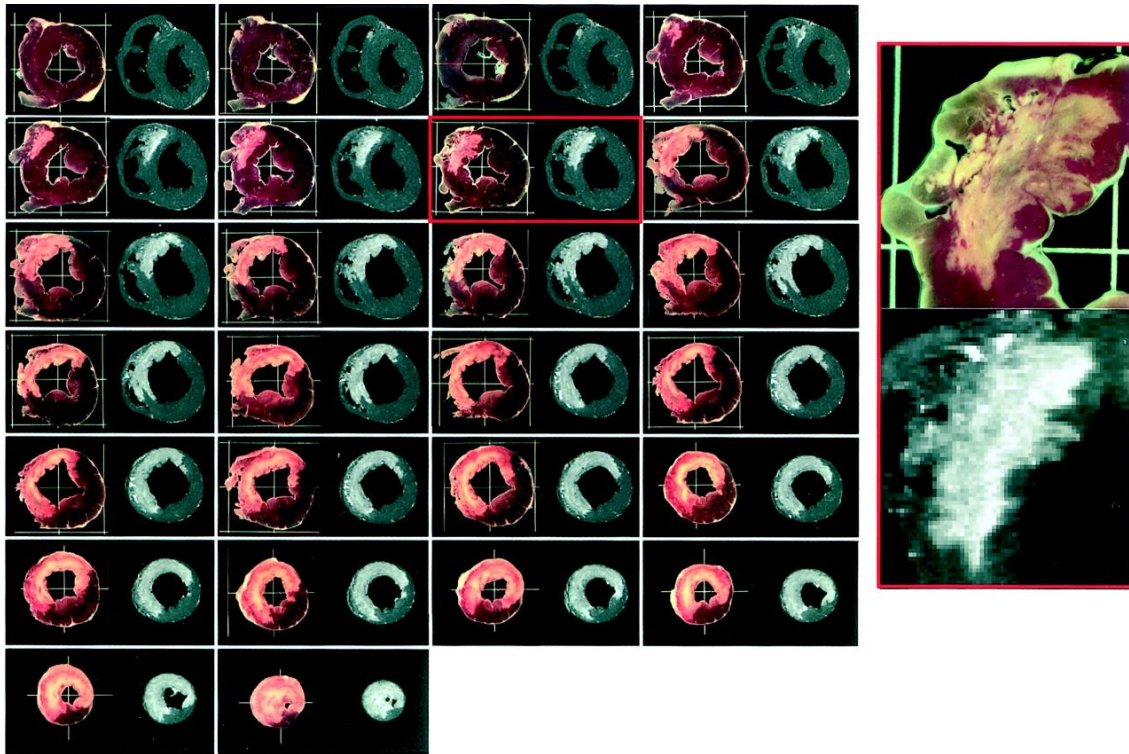


Figura 1. Esquerda, Comparação de imagens de RM ex vivo com cortes corados com TTC em animal aos 3 dias após o infarto. Os cortes são dispostos da base ao ápice começando no canto superior esquerdo e avançando da esquerda para a direita, de cima para baixo. Direita, visão ampliada. Reprodução da referência 15 (Kim e col. Circulation 1999)

Marcadores Séricos

Galectina-3

As galectinas são lectinas que ligam-se aos β -galactosídeos, perfazendo um total de 15 subtipos. Estão localizadas geralmente no citoplasma, mas também podem estar no núcleo ou na matriz extracelular. Embora as galectinas possam ser secretadas, não há sequência de sinal específica. Por não ter receptores específicos, elas se ligam a diferentes antígenos e receptores, sempre de maneira carboidrato-dependente¹⁷. A galectina-3 (gal-3) é uma proteína de aproximadamente 30kDa que, em seres humanos, é codificada pelo gene LGALS3¹⁸.

A secreção de gal-3 por macrófagos foi inferida pela primeira vez quando esta proteína foi identificada como antígeno de superfície em macrófagos Mac-2. No rim e nas células epiteliais intestinais polarizadas, foi encontrada evidência direta de sua

secreção, que parece aumentar de forma expressiva em resposta ao estresse inflamatório¹⁷. A primeira molécula citosólica identificada como ligante a gal-3 in vivo foi a Bcl-2, envolvida na regulação da apoptose. Após, várias outras moléculas envolvidas na via de sinalização apoptótica foram identificadas como ligantes a gal-3. A gal-3 extracelular exibe numerosos efeitos autócrinos e parácrinos, sendo mediador da adesão celular, da ativação e quimiotração para determinados tipos celulares. Mostrou-se capaz de ligar-se à laminina, à fibronectina, bem como a heparina, elastina, colágeno IV e tenascina. Dessa forma, a gal-3 atua em diversos processos biológicos, como a homeostase celular, respostas imunes, organogênese e angiogênese¹⁹.

Em modelo animal, projetado para estudar a aterosclerose, foi encontrado gal-3 em células espumosas²⁰. A inativação da expressão de gal-3, neste estudo, levou à redução da carga aterosclerótica em camundongos deficientes em ApoE, provavelmente devido ao seu papel na transformação de macrófagos em células espumosas. As células espumosas da placa, por sua vez, secretam gal-3, atraindo monócitos e macrófagos, estimulando ainda mais a progressão da aterosclerose²¹.

Em um estudo de Nangia-Makker e cols. a gal-3 mostrou capacidade de estimular a angiogênese in vitro e in vivo, aumentando a densidade dos vasos em tumores de camundongos. Isso, provavelmente, através da sinalização do VEGF, porque as células endoteliais gal-3-*knockdown* não promoveram a angiogênese in vitro^{22,23}.

Henderson e cols. demonstraram que a inativação do gene da gal-3 bloqueia a ativação da célula estrelada hepática e a expressão do colágeno no fígado, atenuando a fibrose hepática induzida por tetracloreto. Em ratos gal-3-*knockdown*, a redução da fibrose ocorreu a despeito da equivalência da lesão hepática, inflamação e expressão de TGF- β . O TGF- β não conseguiu ativar células estelares hepáticas gal-3-*knockdown*, sugerindo que a gal-3 é necessária para a produção de matriz extracelular mediada por TGF- β ²⁴.

A relação da gal-3 com a fibrose induzida por aldosterona foi estudada posteriormente em modelo animal. Foi observado que a aldosterona levou à expressão de gal-3 na túnica média aórtica e, por sua vez, a sobre-expressão de gal-3 aumentou a produção de colágeno tipo I. Além disso, a inibição da gal-3 in vitro e in vivo bloqueou a inflamação induzida por aldosterona, a deposição de colágeno tipo I e o remodelamento vascular²⁵.

Avaliação da fibrose em diferentes contextos de arritmia

Fibrilação Atrial

A fibrilação atrial (FA) está associada a risco 5 vezes maior de AVC, incidência 3 vezes maior de IC congestiva e ao dobro de mortalidade. Sua fisiopatologia não encontra-se completamente compreendida. Entretanto é sabido que nas formas paroxísticas há predominância de *triggers* anômalos, enquanto que nas persistentes estão estabelecidos distúrbios da condução elétrica relacionados à fibrose e dilatação atrial²⁶. A fibrose pode ser detectada no átrio esquerdo (AE) de pacientes com FA, já tendo se mostrado como preditor independente para progressão da doença^{27,28}. Embora a LGE-CMR esteja estabelecida na avaliação da fibrose ventricular, a detecção de fibrose atrial é desafiadora devido à limitada resolução de imagem, fina espessura da parede (1-2 mm) e à diversidade morfológica atrial. Apesar dessas limitações, alguns grupos desenvolveram protocolos rígidos de avaliação de LGE atrial e, com isso, buscaram correlação com resultados específicos. O estudo DECAAF, publicado em 2014, demonstrou relação linear entre o grau LGE atrial e a recorrência FA após ablação por radiofrequência. Não obstante, ainda faltam dados suficientes para traçar um ponto de corte para qual a extensão LGE implicaria em futilidade para a estratégia de ablação²⁹.

Em estudo com 145 pacientes submetidos à dosagem de gal-3 após 3-5 dias de IAM com elevação do segmento ST, níveis mais elevados de gal-3 relacionaram-se à maior incidência de FA nova³⁰. Recente estudo caso-controle de Selcoki e cols. demonstrou associação independente dos níveis de gal-3 com FA paroxística³¹, achado semelhante ao encontrado por Gurses e cols. em pacientes com FA persistente³². Contrariamente, em coorte de Framingham com mais de 3000 participantes, seguidos por 10 anos, níveis elevados de gal-3, após ajuste para possíveis fatores confundidores, não foi preditor de incidência de FA³³. Um grupo de pesquisadores chineses dosou gal-3 antes da primeira ablação em 50 indivíduos e observou associação de níveis elevados com recidiva da FA, mesmo após ajuste para o diâmetro do AE. De acordo com a análise de curva ROC, o ponto de corte de 5,83ng/mL teve sensibilidade de 60% e especificidade de 72% para a predição de recorrência³⁴.

MiocardioPatia Hipertrófica

O LGE está presente em até 65% dos pacientes com MCH, tipicamente em um padrão de irregular mesocárdico em áreas de hipertrofia e pontos de inserção do ventrículo direito (VD)³⁵. Neste contexto, a avaliação do LGE pode ser usada como ferramenta prognóstica de diferentes maneiras. Rubinshtein e cols. reuniu 424 pacientes e observou que pacientes genótipo-positivos mais frequentemente apresentavam LGE, e que em todos os casos de receberam terapias do CDI ou tiveram MS foi identificado LGE³⁶. Um grupo de pesquisa de Detroit reuniu dados e publicou uma meta-análise avaliando o potencial do LGE na predição de MS. Incluindo 6 estudos, com total de 3067 pacientes e seguimento médio de 3 anos, foi observado que a incidência de MS e MS reanimada em pacientes com MCH e LGE positivo foi significativamente superior aos pacientes sem LGE (OR = 2,52; IC95%: 1,44-4,4; $p = 0,001$)³⁷.

Pouco foi estudado sobre o uso prognóstico de biomarcadores de fibrose na MCH. Um estudo de Gawor e cols. investigou a relação dos níveis de gal-3 e ST2 séricos em uma coorte de pacientes com MCH comparando com controles. As concentrações de ST2 e gal-3 foram significativamente maiores em pacientes com MCH, entretanto não tiveram relação significativa com risco de MS, síncope ou história familiar de MS³⁸.

Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito

A displasia arritmogênica do ventrículo direito (DAVD) é uma miocardioPatia hereditária caracterizada por anormalidades estruturais e elétricas devido à substituição do miocárdio por tecido gorduroso e fibroso. É mais prevalente em países mediterrâneos e pode ser fatal por IC progressiva ou arritmias ventriculares. Embora o VD seja a câmara predominantemente doente, o ventrículo esquerdo (VE) pode também ser afetado em alguns casos. O diagnóstico, devido à heterogeneidade da apresentação, é desafiador. Em um esforço para objetivar o diagnóstico, Marcus e cols. desenvolveu os critérios da *Task Force*, dentre os quais estão aneurismas de VD, dilatação do VD e redução da fração de ejeção ventricular direita³⁹. Embora o LGE não faça parte destes critérios, estudos apontam para possível papel diagnóstico e prognóstico. Tandri e cols. avaliou presença de LGE em 30 pacientes, 12 deles com DAVD diagnosticada pelos critérios clássicos e 18 controles, LGE foi observado em 8 dos 12 pacientes diagnosticados com DAVD e em nenhum dos controles. Estudo eletrofisiológico (EEF) foi realizado em 10 dos pacientes diagnosticados com DAVD, em 6 deles foi induzida

taquicardia ventricular, todos apresentando LGE na CMR. Por outro lado, nenhum dos quatro com VT não indutível tinham LGE ($p= 0,01$)⁴⁰. Apesar desses resultados, inúmeras limitações impediram a inclusão de LGE nos critérios diagnósticos. Entre elas a dificuldade impostas pela fina espessura da parede do VD, a alta variabilidade de protocolo de avaliação entre centros e a necessidade de elevada experiência do médico, pela dificuldade em distinguir gordura de fibrose por sequências LGE⁴¹.

Oz e cols. publicou um estudo comparando 29 pacientes com DAVD e CDI implantado com 24 controles. Aqueles com DAVD apresentaram maiores níveis gal-3 quando comparados ao grupo controle ($16,9\pm 2,6$ ng/mL vs. $11,3\pm 1,8$ ng/mL, $p<0,001$). Dez pacientes apresentaram arritmias ventriculares no seguimento. Em análise multivariada, os níveis de gal-3 mostraram ser preditores independentes de eventos arrítmicos (HR= 1,05; IC95%: 1,00-1,11; $p = 0,01$)⁴².

Sarcoidose

A sarcoidose é uma doença inflamatória sistêmica caracterizada pelo desenvolvimento, mediado por linfócitos CD4+, de granulomas não necrosantes. O envolvimento cardíaco, apesar de evento raro, relaciona-se a apresentação grave caracterizada por distúrbios de condução atrioventricular (AV), arritmias atriais e ventriculares. O dano miocárdico é seguido de fibrose reparadora. Viles-Gonzalez e cols. investigou 100 pacientes com evidência de envolvimento cardíaco demonstrado por CMR, PET ou BEM por um período médio de 5,8 anos. A prevalência de de arritmias supraventriculares foi de 32%, sendo FA a mais comum (18%), seguida de taquicardia atrial (7%), flutter atrial (5%) e taquicardia reentrada nodal AV (2%)⁴³. Em não havendo ensaios clínicos sobre prevenção de MS em sarcoidose, a estratificação de risco ganha importância. Nadel e cols. estudou a relevância prognóstica do LGE em 106 indivíduos com sarcoidose sistêmica e descobriu que a presença de LGE esteve associado a maior incidência de TV, fibrilação ventricular (VF) ou MS em 36 meses de seguimento (38% vs. 1,4%, $p= 0,001$)⁴⁴. Uma meta-análise reuniu 10 estudos de 2009 a 2016, compreendendo 760 pacientes com diagnóstico ou suspeita de sarcoidose cardíaca com seguimento médio de 3 anos. A prevalência média de LGE foi de 33%. Os pacientes com LGE apresentaram maior probabilidade de morte por qualquer causa (OR = 3,06; $p < 0,03$) e eventos arrítmicos (OR = 10,74; IC95%: 4,12-27,9; $p < 0,00001$). Embora, em análise de subgrupo, a associação foi restrita àqueles com FE > 50%⁴⁵.

Insuficiência Cardíaca Não-Isquêmica

Trata-se de designação dada a diferentes etiologias de insuficiência cardíaca não relacionadas a dano isquêmico cardíaco por doença arterial coronariana. Contrariamente à IC isquêmica, onde a indicação de CDI é consolidada (ensaios MADIT-I, MADIT-II e SCD-HeFT), no contexto da ICNI o implante de CDI ainda é motivo de debate⁴⁶⁻⁴⁸. Os resultados discordantes dos grandes ensaios clínicos podem em parte ser explicados pela seleção de indivíduos de diferentes faixas de risco para MS em cada estudo^{49,50}. Frente a tal indefinição, ferramentas que propiciem melhor estratificação de risco tornam-se necessárias na prática clínica.

Em estudo pioneiro realizado por Nazarian e cols. foi avaliado a extensão de LGE em 26 indivíduos com ICNI submetidos a EEF. Observou-se que a extensão de LGE relacionou-se, independentemente da FE, à indução de taquicardia ventricular (TV)⁵¹. Assomull e cols., no ano seguinte, comparando 2 grupos de pacientes com ICNI, observou que a presença de fibrose mesocárdica relacionou-se a risco 5 vezes maior de MS ou TV⁵². Em estudo prospectivo, com 472 pacientes, de Gulati e cols., a fibrose mesocárdica mostrou-se preditora de MS ou MS abortada (HR = 5,24; IC95%: 3,15-8,72; $p = 0,001$)⁵³. Apesar das evidências, nenhum ensaio clínico randomizou pacientes com ICNI para receber CDI ou não baseado na presença de LGE. Um estudo de coorte de Leyva e cols. comparou os resultados de pacientes com ICNI submetidos à terapia de ressincronização cardíaca associada ou não a desfibrilador. Somente aqueles com fibrose por LGE-CMR tiveram o benefício da adição de desfibrilador à ressincronização cardíaca⁵⁴. Nenhum estudo até o presente momento avaliou o papel da gal-3 como marcador prognóstico em coorte de formada unicamente por pacientes com ICNI. Francia e cols. dosaram gal-3 em pacientes com IC de qualquer etiologia, FE<35% e CDI implantado como prevenção primária. Neste estudo níveis elevados de gal-3 estiveram associados com arritmia ventricular sustentada. Em avaliação de curva ROC o ponto de coorte de melhor acurácia foi 17 ng/ml⁵⁵. Estudo de um grupo chinês liderado por Da-Jun Hu dosou gal-3 em grupo formado em parte por pacientes com ICNI e em parte por MCH. De maneira semelhante, observou-se que gal-3 elevada se correlacionou com o desfecho composto por morte cardiovascular, arritmia ventricular sustentada ou piora da IC⁵⁶.

Conclusão

A IC é uma doença de caráter prevalente e de alta morbimortalidade. A fibrose miocárdica está intimamente relacionada a fisiopatologia do remodelamento cardíaco, estando onipresente na IC, micro ou macroscopicamente. Até 30% dos óbitos, no contexto da IC, se dá por arritmias ventriculares, sendo a fibrose determinante de anomalias de condução elétrica e reentrada relacionadas a morte súbita. Métodos de imagem podem ser usados para avaliação de fibrose, sendo, atualmente, a ressonância magnética com avaliação do LGE o mais empregado. Apesar de cada vez mais precisa a LGE-CMR apresenta importante limitação em pacientes com próteses metálicas ou insuficiência renal grave. A galectina-3, uma lectina secretada por macrófagos, relacionada a deposição de colágeno, surgiu recentemente como potencial marcador de fibrose. Estudos iniciais em diferentes miocardiopatias mostraram seu potencial preditor de eventos arrítmicos e também morte cardiovascular. Na ICNI, o implante de CDI é controverso, sendo assim, a investigação de fatores determinantes de risco de MS e mortalidade geral faz-se necessária para otimização do benefício desta terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, *et al.* Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure. *Circulation* 2002; **106**: 3068-3072.
- 2 Godoy HL, Silveira JA, Segalla E, Almeida DR. Hospitalização e mortalidade por insuficiência cardíaca em hospitais públicos no município de São Paulo . *Arq. Bras. Cardiol.* . 2011; **97**: 402–7.
- 3 Koutalas E, Kanoupakis E, Vardas P. Sudden cardiac death in non-ischemic dilated cardiomyopathy: A critical appraisal of existing and potential risk stratification tools. *Int J Cardiol* 2013; **167**: 335–41.
- 4 Gauí EN, Klein CH, Oliveira GMM de. Mortalidade por insuficiência cardíaca: análise ampliada e tendência temporal em três estados do Brasil. *Arq Bras Cardiol* 2010; **94**: 55–61.
- 5 Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN. Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: The road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol* 2014; **70**: 83–91.
- 6 de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, *et al.* Slow conduction in the infarcted human heart course of activation. *Circulation* 1993; **88**: 915 LP-926.
- 7 De Jong S, Van Veen TAB, Van Rijen HVM, De Bakker JMT. Fibrosis and cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; **57**: 630–8.
- 8 Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH. Assessment of Nonischemic Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; **56**: 89–97.
- 9 Mimbs JW, Donnell M, Bauwens D, Miller JW, Sobel BE. The dependence of ultrasonic attenuation and backscatter on collagen content in dog and rabbit hearts. *Circ Res* 1980; **47**: 49 LP-58.
- 10 Baumgartner H, Porenta G, Lau Y-K, *et al.* Assessment of myocardial viability by dobutamine echocardiography, positron emission tomography and thallium-201 SPECT. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**: 1701–8.
- 11 Gjesdal O, Hopp E, Vartdal T, *et al.* Global longitudinal strain measured by two-dimensional speckle tracking echocardiography is closely related to myocardial infarct size in chronic ischaemic heart disease. *Clin Sci* 2007; **113**: 287-296.
- 12 Roes SD, Mollema SA, Lamb HJ, van der Wall EE, de Roos A, Bax JJ. Validation of Echocardiographic Two-Dimensional Speckle Tracking Longitudinal Strain Imaging for Viability Assessment in Patients With Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction and Comparison With Contrast-Enhanced

- Magnetic Resonance Imaging. *Am J Cardiol* 2018; **104**: 312–7.
- 13 Leong DP, Madsen PL, Selvanayagam JB. Non-invasive evaluation of myocardial fibrosis: implications for the clinician. *Heart* 2010; **96**: 2016–24.
- 14 Wagner A, Mahrholdt H, Holly TA, *et al.* Contrast-enhanced MRI and routine single photon emission computed tomography (SPECT) perfusion imaging for detection of subendocardial myocardial infarcts: an imaging study. *Lancet* 2017; **361**: 374–9.
- 15 Kim RJ, Fieno DS, Parrish TB, *et al.* Relationship of MRI delayed contrast enhancement to irreversible injury, infarct age, and contractile function. *Circulation* 1999; **100**: 1992–2002.
- 16 Captur G, Manisty C, Moon JC. Cardiac MRI evaluation of myocardial disease. *Heart* 2016; **102**: 1429–1435.
- 17 Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20807–10.
- 18 Raz A, Carmi P, Raz T, Hogan V, Mohamed A, Wolman SR. Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of a Human Galactoside-binding Protein. *Cancer Res* 1991; **51**: 2173-2178.
- 19 Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2006; **1760**: 616–35.
- 20 Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol* 2008; **172**: 247–55.
- 21 Sano H, Hsu DK, Yu L, *et al.* Human Galectin-3 Is a Novel Chemoattractant for Monocytes and Macrophages. *J Immunol* 2000; **165**: 2156-2164.
- 22 Markowska AI, Liu F-T, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med* 2010; **207**: 1981 LP-1993.
- 23 Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, *et al.* Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. *Am J Pathol* 2017; **156**: 899–909.
- 24 Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, *et al.* Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 2006; **103**: 5060–5.
- 25 Calvier L, Miana M, Reboul P, *et al.* Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 67–75.

- 26 Chen PS, Chou CC, Tan AY, *et al.* The mechanisms of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; **17**: 2–7.
- 27 Kostin S, Kostin S, Klein G, *et al.* Structural correlate of atrial brillation in human patients. *Cardiovasc Res* 2002; **54**: 361–79.
- 28 Xu J, Cui G, Esmailian F, *et al.* Atrial Extracellular Matrix Remodeling and the Maintenance of Atrial Fibrillation. *Circulation* 2004; **109**: 363–8.
- 29 Marrouche NF, Wilber D, Hindricks G, *et al.* Association of Atrial Tissue Fibrosis Identified by Delayed Enhancement MRI and Atrial Fibrillation Catheter Ablation. *Jama* 2014; **311**: 498.
- 30 Szadkowska I, Wlazeł RN, Migala M, Szadkowski K, Zielińska M, Paradowski M, Pawlicki L. The association between galectin-3 and clinical parameters in patients with first acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary angioplasty *Cardiol J.* 2013; **20**: 577–82.
- 31 Selcoki Y, Aydin HI, Celik TH, *et al.* Galectin-3: A biochemical marker to detect paroxysmal atrial fibrillation? *Clin Investig Med* 2016; **39**: S197–203.
- 32 Gurses KM, Yalcin MU, Kocyigit D, *et al.* Effects of Persistent Atrial Fibrillation on Serum Galectin-3 Levels. *Am J Cardiol* 2017; **115**: 647–51.
- 33 Ho JE, Yin X, Levy D, *et al.* Galectin 3 and incident atrial fibrillation in the community. *Am Heart J* 2014; **167**: 729–734.e1.
- 34 Wu X-Y, Li S-N, Wen S-N, *et al.* Plasma galectin-3 predicts clinical outcomes after catheter ablation in persistent atrial fibrillation patients without structural heart disease. *Europace* 2015; **17**: 1541–7.
- 35 Rudolph A, Abdel-Aty H, Bohl S, *et al.* Noninvasive Detection of Fibrosis Applying Contrast-Enhanced Cardiac Magnetic Resonance in Different Forms of Left Ventricular Hypertrophy. Relation to Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009; **53**: 284–91.
- 36 Rubinshtein R, Glockner JF, Ommen SR, *et al.* Characteristics and clinical significance of late gadolinium enhancement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Hear Fail* 2010; **3**: 51–8.
- 37 Briasoulis A, Mallikethi-Reddy S, Palla M, Alesh I, Afonso L. Myocardial fibrosis on cardiac magnetic resonance and cardiac outcomes in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis. *Heart* 2015; **101**: 1406–11.
- 38 Gawor M, Śpiewak M, Janas J, *et al.* The usefulness of soluble ST2 and galectin-

- 3 as novel biomarkers for better risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy. *Kardiol Pol* 2017;75:997-1004
- 39 Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, *et al.* Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/Dysplasia: Proposed modification of the task force criteria. *Circulation* 2010; **121**: 1533–41.
- 40 Tandri H, Saranathan M, Rodriguez ER, *et al.* Noninvasive detection of myocardial fibrosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy using delayed-enhancement magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2005; **45**: 98–103.
- 41 Satoh H, Sano M, Suwa K, *et al.* Distribution of late gadolinium enhancement in various types of cardiomyopathies: Significance in differential diagnosis, clinical features and prognosis. *World J Cardiol* 2014; **6**: 585–601.
- 42 Oz F, Onur I, Elitok A, *et al.* Galectin-3 correlates with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and predicts the risk of ventricular -arrhythmias in patients with implantable defibrillators. *Acta Cardiol* 2017; **72**: 453–9.
- 43 Viles-Gonzalez JF, Pastori L, Fischer A, Wisnivesky JP, Goldman MG, Mehta D. Supraventricular Arrhythmias in Patients With Cardiac Sarcoidosis. *Chest* 2017; **143**: 1085–90.
- 44 Nadel J, Lancefield T, Voskoboinik A, Taylor AJ. Late gadolinium enhancement identified with cardiacmagnetic resonance imaging in sarcoidosis patients is associated with long-term ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2015; **16**: 634–41.
- 45 Coleman GC, Shaw PW, Balfour PC, *et al.* Prognostic Value of Myocardial Scarring on CMR in Patients With Cardiac Sarcoidosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2017; **10**: 411–20.
- 46 Bardy GH, Lee KL, Mark DB, *et al.* Amiodarone or an Implantable Cardioverter–Defibrillator for Congestive Heart Failure. *N Engl J Med* 2005; **352**: 225–37.
- 47 Moss AJ, Hall WJ, Cannom DS, *et al.* Improved Survival with an Implanted Defibrillator in Patients with Coronary Disease at High Risk for Ventricular Arrhythmia. *N Engl J Med* 1996; **335**: 1933–40.
- 48 Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, *et al.* Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med* 2002; **346**: 877–83.

- 49 Kadish A, Dyer A, Daubert JP, *et al.* Prophylactic Defibrillator Implantation in Patients with Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Group* 2004; : 2151–8.
- 50 Køber L, Thune JJ, Nielsen JC, *et al.* Defibrillator Implantation in Patients with Nonischemic Systolic Heart Failure. *N Engl J Med* 2016; **375**: 1221–30.
- 51 Nazarian S, Bluemke DA, Lardo AC, *et al.* Magnetic resonance assessment of the substrate for inducible ventricular tachycardia in nonischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2005; **112**: 2821–5.
- 52 Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, *et al.* Cardiovascular Magnetic Resonance, Fibrosis, and Prognosis in Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006; **48**: 1977–85.
- 53 Gulati A, Jabbour A, TF I, *al et.* Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA* 2013; **309**: 896–908.
- 54 Leyva F, Zegard A, Acquaye E, *et al.* Outcomes of Cardiac Resynchronization Therapy With or Without Defibrillation in Patients With Nonischemic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2017; **70**. DOI:10.1016/j.jacc.2017.07.712.
- 55 Francia P, Adduci C, Semprini L, *et al.* Osteopontin and galectin-3 predict the risk of ventricular tachycardia and fibrillation in heart failure patients with implantable defibrillators. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014; **25**: 609–16.
- 56 Hu DJ, Xu J, Du W, Zhang JX, Zhong M, Zhou YN. Cardiac magnetic resonance and galectin-3 level as predictors of prognostic outcomes for non-ischemic cardiomyopathy patients. *Int J Cardiovasc Imaging* 2016; **32**: 1725–33.
- 57 Binas D, Daniel H, Richter A, Ruppert V, Schieffer B, Pankuweit S. Prognostic value of sST2 and Galectin-3 considering different etiologies in non-ischemic heart failure. *Eur Heart J* 2016; **37**: 918.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença de alta prevalência e considerável morbimortalidade. Fazem parte do seu tratamento o uso de fármacos que alteram a história natural da doença (beta-bloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas da aldosterona) e dispositivos implantáveis como cardiodesfibriladores (CDIs) e o ressincronizador cardíaco. Na IC de etiologia não-isquêmica (ICNI) ensaios clínicos têm mostrado resultados discordantes no que diz respeito à redução de mortalidade total com o implante de CDIs. Apesar disso, estes estudos apresentam concordância na eficácia destes dispositivos quanto à redução de morte súbita (MS). Acredita-se que a nulidade de tal efeito na mortalidade possa estar ocorrendo devido a ICNI ter uma incidência de arritmias ventriculares inferior àqueles com etiologia isquêmica, ou seja, que trate-se de menor magnitude de efeito. Uma vez que a ICNI é um conjunto de diferentes etiologias com diferente perfil de risco para MS, a generalização dos dados obtidos nos ensaios clínicos é difícil. Este fato, associado ao fato de que o implante de CDI é um procedimento invasivo e de alto custo para a realidade brasileira, motiva a procura de parâmetros clínicos que estratifiquem o risco de MS e mortalidade geral no paciente com ICNI, permitindo selecionar o paciente com maior magnitude de benefício com o implante.

A fibrose miocárdica é historicamente reconhecida como substrato de arritmias em geral. Sua identificação não-invasiva até há poucos anos era feita unicamente por métodos de imagem, entretanto cada um com limitações inerentes a técnica. O descoberta de marcadores do metabolismo do colágeno permitiu que a avaliação de fibrose pudesse também ser feita através de análise de amostra de sangue. A galectina-3 tem mostrado em múltiplos trabalhos capacidade preditora de eventos arrítmicos e de morte cardiovascular em diversos contextos de insuficiência cardíaca. Nenhum dos trabalhos publicados até o presente momento testou a capacidade prognóstica da galectina-3 em coorte composta unicamente por pacientes com ICNI. Em se mostrando preditor de arritmias ventriculares, a galectina-3 poderia auxiliar na estratificação de risco de pacientes com ICNI, auxiliando a selecionar o candidato ideal para o implante, impactando na prática clínica.

HIPÓTESE CONCEITUAL

Níveis elevados de galectina-3 sérica se relacionam de maneira independente com eventos arrítmicos graves e mortalidade no contexto de insuficiência cardíaca não-isquêmica, identificando indivíduos de maior risco.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Determinar o papel da avaliação de galectina-3 sérica na predição de eventos arrítmicos graves em coorte de pacientes com insuficiência cardíaca não-isquêmica, ajustado para outros parâmetros clínicos.

Objetivos Secundários

- ❖ Determinar o papel da avaliação de galectina-3 sérica na predição de morte por todas as causas em coorte de pacientes com insuficiência cardíaca não-isquêmica.
- ❖ Determinar o papel de variáveis clínicas, exames não-invasivos e estudo eletrofisiológico na predição de eventos arrítmicos graves em coorte de pacientes com insuficiência cardíaca não-isquêmica.
- ❖ Determinar o papel de variáveis clínicas, exames não-invasivos e estudo eletrofisiológico na predição de morte por todas as causas em coorte de pacientes com insuficiência cardíaca não-isquêmica.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Predictors of total mortality and serious arrhythmic events in non-ischemic heart failure patients: the role of galectin-3

Adriano Kochi MD, Mauricio Pimentel MD ScD, Michael Andrades PhD,
Leandro Zimmerman MD ScD, Luis E. Rohde MD ScD

From the Cardiovascular Division, Hospital de Clinicas de Porto Alegre and the
Post-Graduate Program in Cardiovascular Science and Cardiology, Medical School,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence:

Luis E. Rohde

Cardiovascular Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, 2nd floor, room 2060

rohde.le@gmail.com

ABSTRACT

Background: Data from clinical trials are not consensual about the efficacy of cardiac defibrillators in heart failure (HF) patients of non-ischemic etiology. Risk stratification for major arrhythmic events, beyond estimates of left ventricular ejection fraction (LVEF), remains clinically challenging. Fibrosis has been shown to be an independent risk factor for arrhythmias. Galectin-3 is a serum marker of fibrosis that might help in arrhythmia and mortality risk stratification in this specific scenario.

Objective: This study aims to determine the role of serum galectin-3 level as predictor of major arrhythmic events and total mortality in a cohort of non-ischemic heart failure (HF) patients.

Methods: We conducted a prospective cohort study that enrolled 148 non-ischemic HF patients who underwent a comprehensive clinical and laboratory evaluation including two-dimensional Doppler echocardiography, 24h Holter monitoring, cardiopulmonary exercise testing (CPX) and invasive electrophysiological study (EPS). Serum galectin-3 was measured at baseline by ELISA. The primary end-point was defined as the occurrence of arrhythmic syncope, appropriate ICD therapy, sustained ventricular tachycardia (VT) or sudden cardiac death (SCD). Secondary end-point was defined as death by any cause.

Results: In a median follow-up of 941 (IQR 440-1241) days the primary outcome occurred in 26 patients (17.5%) and 30 patients (20%) died. Serum galectin-3 > 22.5 ng/mL (highest quartile) was not able to predict serious arrhythmic events in this cohort (HR: 1.12, $p=0.78$). Independent predictors for the primary outcome were left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) > 73mm (HR: 3.70, $p=0.001$), exercise periodic breathing (EPB) (HR: 2.66, $p=0.01$), and non-sustained ventricular tachycardia (NSVT) (HR: 3.47, $p=0.027$). Predictors of total mortality in multivariable analysis were elevated galectin-3 (HR: 3.69, $p=0.001$), LVEDD >73mm (HR: 3.35, $p=0.003$), EPB (HR: 3.06, $p=0.006$), and NSVT >8 beats (HR 3.95, $p=0.007$). The absence of all predictors of risk was associated with a 91.1% negative predictive value for the primary outcome and a 96.6% for total mortality.

Conclusions: In this prospective cohort of non-ischemic HF patients on optimized medical treatment, galectin-3 levels did not predict major arrhythmic events. Elevated galectin-3 levels, however, were independently associated to total mortality. Absence of

all predictors of risk identified a substantially prevalent sub-group of HF patients with an excellent prognosis.

INTRODUCTION

Despite impressive therapeutic advances, heart failure (HF) is still marked by disabling symptoms and persistently elevated mortality¹. Approximately 30% of the overall mortality in HF patients is attributed to sudden cardiac death (SCD)^{2,3}. Implantable cardiac defibrillators (ICD) are a consolidated treatment strategy particularly in HF due to coronary artery disease, as several individual clinical trials (MADIT-I, MADIT-II, and SCD-HeFT trials) have demonstrated unquestionable efficacy in hard clinical outcomes⁴⁻⁶. However, there is a considerable debate in the overall efficacy of ICD implant in patient with non-ischemic cardiomyopathy (NICM). Clinical trials approaching this specific scenario have demonstrated conflicting results. The DEFINITE and DANISH trials enrolled only NICM patients and all-cause mortality reduction was not observed, although ICD implant impacted on SCD rates and some subgroups did experience benefit in all-cause mortality^{7,8}.

These findings can be explained in part by the disparity in SCD risk for different HF etiologies. Ischemic heart disease is notably associated to an increased risk of life-threatening arrhythmias, attributable in part to the presence of fibrotic scars that are involved in arrhythmogenesis⁶. Fibrosis, nonetheless, is omnipresent in the myocardial tissue of HF patients, independently of their etiology and has been traditionally associated to SCD⁹⁻¹². Late gadolinium enhancement (LGE) cardiovascular magnetic resonance (CMR) imaging is a non-invasive diagnostic tool that identifies myocardial fibrosis and has been proposed as a potential predictor of arrhythmic events and mortality in NICM^{12,13}. A broad clinical application of LGE-CMR is partially limited because of its costs and restricted availability. In this scenario, a simple serum biomarker that might identify the burden of myocardial fibrosis could potentially help to stratify the risk of SCD in the clinical arena^{14,15}. Galectin-3 have been recently

evaluated as a biomarker of cardiac remodeling and fibrosis, as its production is directly involved in the initiation and progression of tissue scarring¹⁵. Preliminary studies have demonstrated that high serum galectin-3 levels predict sustained ventricular arrhythmias in HF patients at high risk for SCD and major cardiac events in dilated and hypertrophic cardiomyopathy^{10,16}.

Recently, our group identified 3 independent predictors of serious arrhythmic events in a cohort study of non-ischemic HF patients: increased left ventricular end-diastolic diameters (>73 mm), presence of exercise periodic breathing on cardiopulmonary exercise testing and non-sustained ventricular tachycardia on 24h Holter monitoring¹⁷. The objective of the present study was to assess whether levels of galectin-3 could be a significant predictor of risk of arrhythmic events and total mortality in NICM thus adding predictive value beyond these 3 clinical markers of risk.

METHODS

We performed a prospective observational study that enrolled adult patients under optimized treatment in a dedicated HF outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre/RS - Brazil) from March 2011 to November 2017. Participants had a previous diagnosis of systolic HF of non-ischemic etiology. Systolic HF was defined as LVEF <40% assessed by two-dimensional transthoracic echocardiography or CMR. Non-ischemic HF was defined as the presence of clinical HF and the absence of atherosclerotic coronary lesions >75% at coronary arteriography, or absence of necrotic or ischemic areas by cardiac single photon emission computed tomography (SPECT) or LGE-CMR. Exclusion criteria were history of SCD, cardiogenic syncope, sustained ventricular tachycardia (VT), advanced cerebrovascular disease and life expectancy less than 1 year due to non-cardiovascular diseases. This study had approval by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A written informed consent was obtained from all participants. After informed consent, patients underwent a detailed clinical evaluation, routine laboratory tests, non-invasive cardiac exams and invasive electrophysiological study (EPS). Non-invasive cardiac exams included routine electrocardiogram (EKG), 24-h continuous EKG (Holter) recording and cardiopulmonary exercise test (CPET). During EPS, blood was drawn for galectin-3 analysis.

EKG and 24-h Holter monitoring. The 12-lead EKG was performed with a digital device (Mortara ELI 350, Mortara Instrument, Milwaukee, Wisconsin, USA). The 24-h Holter monitoring was performed using a digital record (SEER Light) and analyzed with the GE Marquette MARS (GE Healthcare, Wauwatosa, Wisconsin, USA)

software, by an experienced cardiologist. Non-sustained VT was defined as a run of 3 or more consecutive premature ventricular beats ≥ 100 bpm.

Cardiopulmonary exercise test. CPET was performed on a standard treadmill (INBRAMEDTM KT 10200, Porto Alegre - Brazil) with a calibrated computer-based gas analyzer (Cortex Biophysik Metalyzer 3B Stationary CPX system, M13B2.1, Leipzig - Germany). A ramp-staged protocol was used, starting at 2.4 km/h with 1-2% inclination, followed by progressive speed increments of 0.1 to 0.12 km/h every 20s and slope increments of 0.5-1.0% every 60s, until volitional fatigue was reached. Parameters evaluated were: maximal oxygen consumption (VO_2 peak), carbon dioxide output (VCO_2), minute ventilation (VE), gas exchange relation (R), the VE/ VCO_2 slope and presence of exercise periodic breathing (EPB). EPB was defined according to the presence of (1) three or more regular oscillations, clearly discernible from inherent data noise, (2) regularity, defined by the standard deviation of three consecutive cycle lengths (time between two consecutive nadirs) within 20% of the average and (3) minimal average amplitude of ventilatory oscillation of 5L (peak value minus the average of two in-between consecutive nadirs).

Invasive electrophysiological study. Before venous puncture, patients were sedated with midazolam and fentanyl and locally anesthetized with lidocaine. A quadripolar diagnostic catheter was introduced by the right femoral vein and positioned under fluoroscopy in the right ventricular apex. The EP-Tracer system (CardioTekTM, Maastricht - Netherlands) was used for programmed ventricular stimulation (PVS) with an output pulse amplitude twice the threshold and pulse width of 1ms. Stimulation protocol consisted of up to 3 extra-stimuli (S2/S3/S4) delivered after a 10 beat drive

train with a 10ms coupling interval decrement after each cycle, until either ventricular refractoriness or a coupling interval of 200ms was reached. The process was repeated under 3 different basal cycle lengths (600, 500, and 400ms). Sustained VT was defined as monomorphic or polymorphic tachycardia with either ≥ 30 s duration or hemodynamic instability. In cases in which no sustained VT was induced, PVS was repeated with up to 2 extra-stimuli (S2/S3) after intravenous isoproterenol administration (1–4 mcg/min). Induction of monomorphic or polymorphic ventricular tachycardia or ventricular fibrillation (VF) with triple extra-stimuli was considered a true positive finding in the current analysis. In patients with previous permanent pacemaker implanted, the non-invasive electrophysiology study was performed using the pacemaker programmer under the same protocol.

Serum galectin-3 measurement. A 20ml blood sample was collected from the patient by aspiration through the venous sheath by the time of the EPS. The blood sample was centrifuged in a dedicated research laboratory and store under -70°C . Galectin-3 was measure in duplicate using an ELISA assay (BG Medicine, Waltham, USA)

Follow-up and outcomes. Patients had outpatient visits at 3, 6, 18, 24, 30, and 36 months. Those who did not attend follow-up visits were contacted by telephone, home visits, or contact with relatives. Decision about ICD implant was taken by the cardiology staff involved in routine care, with no interference by the research team. The primary endpoint was the composite of cardiac syncope, appropriate ICD therapy, sustained VT or SCD. Shocks were considered to be appropriate if due to VT or VF. There was no ICD tachycardia therapy standardized programming protocol, but the VF zone was typically set to >200 bpm with at least one train of ATP prior to shock while

VT zone was typically set to >180bpm with at least three trains of ATP prior to shock. The secondary endpoints was death from any cause. Outcomes were adjudicated by 2 independent researchers blinded for the baseline evaluation. Discordant cases were evaluated by consensus.

Statistical analysis. All analysis were obtained from the SPSS 19 software. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), median and interquartile range (IQR), or as absolute numbers and percentages. Cutoff for continuous variables were determined using the Q3 percentile (75%). Comparisons between groups were performed using the Student's t-test for continuous variables or chi-square test for categorical. For missing values from CPX (n=13), data were imputed based five multivariable models, build from variables capable of EPB prediction. Cox regression was used for univariable and multivariable analysis of potential predictors for primary and secondary outcomes. A two-tailed *p*-value of 0.05 or less was considered statistically significant. Based on a 26% incidence of ICD therapies derived from a study that evaluated the role of gal-3 in predicting ICD therapy in a cohort comprising NICM and ischemic HF, all with ICD implanted, a sample size of 142 patients was calculated for a 80% power.

RESULTS

Patient characteristics. The study enrolled 148 patients from 296 outpatients screened. Most patients were male (59.5%) with a mean age of 54.8 ± 13 years old. HF etiology was defined as idiopathic in 45.4% of the study sample, followed by hypertensive (16.9%) and alcoholic (12.2%). Most subjects were in functional class NYHA I or II (42.6% and 39.9%, respectively) and the mean LVEF observed was $27.4 \pm 7.5\%$. Pharmacological treatment was optimized in the vast majority: 97% were under of beta-blocker and either an ACE inhibitor or angiotensin receptor blocker, 70% were taking spironolactone and 81% were taking digoxin. Table 1 shows clinical characteristics of the whole cohort and data stratified by galectin-3 level.

Follow-up and outcomes. Median follow-up was 941 days (IQR: 440-1241 days). All patients had at least 2 follow-up visits and only 3 could not be contacted. The primary outcome occurred in 26 patients (17.5%), comprising sudden cardiac death in 13 patients (8.7%), cardiac syncope in 5 (3.3%), appropriate ICD therapy in 7 (4.7%) and sustained VT in one (0.7%) patient. Thirty patients died (20.2%), ten being adjudicated as cardiovascular death (6.7%). Eight patients (5.4%) underwent heart transplant. There were 81 hospital admissions for decompensated heart failure treatment. Forty-eight patients underwent device implant: 17 CRT-D, 19 single chamber ICD, 5 CRT-P, 4 double chamber ICD and 4 single chamber pacemaker.

Galectin-3 levels. Galectin-3 level were measured in stored frozen samples and only one patient could not be adequately assessed because of technical problems with the sample (no outcome was observed in this patient). Mean galectin-3 level was $19 (\pm 9.4)$

ng/mL and the median was 16 ng/mL (IQR: 13.1-22.5). Clinical data stratified by the upper quartile of galectin-3 levels (> 22.5 ng/mL) are described in Table 1.

Univariable and multivariable analyses. For univariable Cox regression we analyzed potential predictors of risk both as continuous variables and stratified by the higher quartile (Q3 versus lower quartiles). In univariable analysis a statistical significant association was observed for the primary outcome (Table 3) with the highest quartile of the diastolic dimension of the left ventricle (HR: 4.13, $p < 0.001$), for cardiopulmonary exercise test parameters (ventilatory efficiency [VE/VCO₂ slope, HR: 2.32, $p = 0.03$] and the presence of exercise periodic breath [HR: 3.36, $p = 0.003$]), for the highest quartile of the HV interval (HR: 2.22, $p = 0.04$) and for non-sustained ventricular tachycardia > 8 beats (HR: 3.27, $p = 0.03$). In this analysis, galectin-3 levels were not a significant predictor of the primary outcome (HR: 1.13, $p = 0.78$). In a multivariable Cox regression model, variables that remained significantly associated with serious arrhythmic events were the diastolic dimension of the left ventricle (HR: 3.70, $p = 0.001$), and the presence of exercise periodic breathing (HR: 2.67, $p = 0.01$) and non-sustained ventricular tachycardia (HR: 3.47, $p = 0.027$).

Predictors of total mortality in univariable analysis were similar, but also included the highest quartile of galectin-3 levels (HR: 2.19, $p = 0.03$), peak VO₂ (HR: 0.92, $p = 0.04$) and the highest quartile of the HV interval (HR: 2.79, $p = 0.005$). Independent predictors of total mortality in the multivariable model (Table 4) were galectin-3 (HR: 3.69, $p = 0.001$), left ventricular diastolic dimension (HR: 3.34, $p = 0.003$), exercise periodic breathing (HR: 3.05, $p = 0.006$) and non-sustained ventricular tachycardia (HR 3.94, $p = 0.007$).

Predictive values. Individual positive predictive values (PPV) for the primary outcome were low (Table 5), but the single variable associated with the highest positive predictive value (PPV) was exercise periodic breathing (38.4%) while the one with the greatest negative predictive value (NPV) was left ventricular diastolic diameter >73mm (88.3%). Ninety patients did not have any of these 3 variables associated with the primary endpoint. Considering patients with absence of all the 3 independent predictors of the primary outcome the NPV is 91.1%. Similar findings were observed for total mortality: NSVT >8 beats was the predictor with the highest PPV (45.5%) and HV interval > 59.4ms associated with the highest NPV (84.9%); those patients that did not present any of the 5 risk markers had a NPV of 96.3% for the incidence of all-cause death.

Survival Curves. Figure 1 shows a Kaplan-Meier survival curve for the primary outcome stratified by the number of predictive variables (LVEDD, EPB, NSVT >8 beats). Since no patient had all the 3 predictors, we observe 3 distinct curves that clearly diverge early, with a statistically significant log-rank p value (<0.001). Similarly, Figure 2 depicts the Kaplan-Meier survival curve for all-cause mortality, stratified by the number of risk markers (Gal-3 >22.5ng/mL, LVEDD, EPB, NSVT >8 beats, HV interval >59.5ms). In Figure 3 we demonstrate the survival curves for different levels of galectin-3, adjusted for the other predictors of all-cause mortality in Cox regression-based plot (p-value of <0.001).

DISCUSSION

The present study is a prospective cohort aiming to evaluate the role of galectin-3 levels as predictor of serious arrhythmic events and total mortality in NICM HF patients. In our study, the primary outcome (SCD, cardiac syncope, sustained VT, or ICD appropriate therapy) occurred in 17.5% of the patients in a median follow-up of 941 days. Galectin-3 had no significant association with the primary outcome neither in univariable nor in multivariable analysis. However, higher galectin-3 levels were an independent predictor of death by any cause. We previously have identified 3 clinical risk predictors of arrhythmic events (left ventricular diastolic diameters, exercise periodic breathing on a cardiopulmonary test and the non-sustained ventricular tachycardia on a 24 hour Holter monitoring) that were confirmed in the current analysis¹⁷. In a clinical scenario where the ICD implant is under debate and considering that several countries face financial constraints to allow unrestricted use, our data may help the decision to choose which patient would get the greater benefit with invasive and costly therapies. Serum levels of galectin-3 may be used to further stratify risk and help in prognostication.

Galectins are a big family of lectins that binds to β -galactosides. A total of 15 members were described. Primarily localized in the cytoplasm, they can be found in the nucleus or in the extracellular matrix as well. Extracellular galectin-3 exhibits numerous autocrine and paracrine effects like cell adhesion, activation and chemoattraction for certain cell types, being able to bind laminin, fibronectin, as well as heparin, elastin, collagen IV and tenascin. In this scenario, galectin-3 affects various biological processes such as cellular homeostasis, immune responses, organogenesis and angiogenesis²¹. Henderson et. al. demonstrated that disruption of the galectin-3 gene

blocks hepatic stellate cell activation and collagen expression in the liver, attenuating CCl4 induced hepatic fibrosis²². Galectin-3 relation to aldosterone-induced fibrosis was posteriorly studied in an animal model. Aldosterone led to galectin-3 expression in aortic tunica media and, in turn, its overexpression increased type I collagen production²³.

The role of galectin-3 as a predictor of future clinical events has been partially assessed in several cardiovascular scenarios. In a study of 145 patients who underwent serum galectin-3 measurement 3-5 days after ST-segment elevation myocardial infarction, higher galectin-3 levels were related to new-onset AF²⁴. A recent case-control study by Selcoki et al. also demonstrated association of galectin-3 levels with paroxysmal AF²⁵, similar to that found by Gurses et al. in persistent AF patients²⁶. A study by Gawor et al. investigated the relation of galectin-3 and sST2 levels in a cohort of patients with HCM and compared to controls. Concentrations of sST2 and galectin-3 were significantly higher in HCM patients than in controls, but both markers had no significant relationship with SCD-risk, history of syncope or family history of SCD²⁷.

The predictive role of galectin-3 has also been assessed in some studies of mixed HF etiologies, but few have explored specifically its role as a predictor of arrhythmic events in non-ischemic HF patients. Francia et al. demonstrated that galectin-3 levels were higher in those presenting with ventricular tachycardia or fibrillation (19.7 ± 8.5 ng/mL vs. 16.2 ± 6.2 ng/mL, $p=0.05$) in 75 HF patients who underwent ICD implantation. Most of their sample (60%), however, was of ischemic cardiomyopathy¹⁶. Hu et al. assessed both galectin-3 levels and late gadolinium enhancement at cardiac magnetic resonance in a prospective cohort that enrolled patients with non-ischemic cardiomyopathy (46% with dilated cardiomyopathy and 56% with hypertrophic cardiomyopathy). Both galectin levels and the presence of late gadolinium

enhancement were independent predictors of major adverse cardiac events. No specific analysis related to arrhythmic risk or total mortality were performed¹⁰. Recently, the Competence Network Heart Failure investigators investigated the role of sST2 and galectin-3 in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy and observed intriguing results. While sST2 levels were independent predictors of cardiac and overall mortality, galectin-3 as a continuous variable did not show any significant association with risk, but intermediate values of galectin-3 were significantly associated with a lower event rate²⁰. Our findings, however, suggests that elevated galectin-3 levels might not be a predictor of arrhythmic risk in a selected sample of non-ischemic HF patients, but could be an important marker of overall mortality. These results are in accordance with a meta-analysis of 9 studies that included a heterogeneous group of HF patients, including different etiologies, HF with preserved left ventricular ejection fraction and acute decompensated HF (heterogeneity between the studies, $I^2= 82.1\%$). In this analysis, for every 1ng/mL of galectin-3 elevation there was a 28% higher mortality rate¹⁹.

Remarkably, the absence of all independent predictors of risk for arrhythmic events (Figure 1) and total mortality (Figure 3), identified a sub-group of patients with overall excellent prognosis in a follow-up of up to 4 years. These results strengthen our previous findings¹⁷ and point out that a better risk stratification is feasible in non-ischemic HF patients.

Some methodological aspects of our protocol deserve consideration. We lost contact with only 3 patients, so they were censored in the last visit. Asymptomatic ventricular arrhythmias could not be detected, as only 48 patients of our cohort underwent device implant. Despite LGE-CMR has been suggested as valid tool for prognosis stratification in HF, only a minority of our patients underwent CMR,

precluding its analysis as a prognostic factor in this cohort. MRI, however, is not widely available to most HF patients worldwide. We acknowledge that our sample size and number of events are relatively small, and as such our results should be considered hypothesis-generating. Most previous studies, however, had similar or smaller sample sizes. Finally, our findings deserve future prospective validation in large-scale studies before broad clinical applicability can be proposed.

Conclusion. In this prospective cohort of non-ischemic HF patients on optimized medical treatment, galectin-3 levels did not predict major arrhythmic events. Three variables were identified as risk makers for the primary outcome: LVEDD >73mm, exercise periodic breathing and non-sustained ventricular tachycardia >8 beats. Elevated galectin-3 levels, however, were independently associated to total mortality. Absence of all predictors of risk identified a substantially prevalent sub-group of patients with an excellent prognosis. In the current scenario of uncertainty about ICD benefit in NICM HF patients, the use of these information might have impact in clinical practice, since it could help to identify those patients with greatest benefit from the therapy.

REFERENCES

- 1- Godoy HL, Silveira JA, Segalla E, Almeida DR. Hospitalização e mortalidade por insuficiência cardíaca em hospitais públicos no município de São Paulo. *Arq Bras Cardiol* 2011;97:402-407.
- 2- Gauí EN, Klein CH, Oliveira GM. Mortalidade por insuficiência cardíaca: análise ampliada e tendência temporal em três estados do Brasil. *Arq Bras Cardiol* 2010;94:55-61.
- 3- Koutalas E, Kanoupakis E, Vardas P. Sudden cardiac death in non-ischemic dilated cardiomyopathy: A critical appraisal of existing and potential risk stratification tools. *Int J Cardiol* 2013;167:335-341.
- 4- Moss AJ, Hall WJ, Cannon DS, Daubert JP, Higgins SL, Klein H, Levine JH, Saksena S, Waldo AL, Wilber D, Brown MW, Heo M. Improved survival with an implanted defibrillator in patients with coronary disease at high risk for ventricular arrhythmia. *N Engl J Med* 1996;335:1933-40.
- 5- Moss AJ, Zareba W, Hall J, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med* 2002;346:877-83.
- 6- Bardy GH, Lee KL, Mark DB, Poole JE, Packer DL, Boineau R, Domanski M, Troutman C, Anderson J, Johnson G, McNulty SE, Clapp-Channing N, Davidson-Ray LD, Fraulo ES, Fishbein DP, Luceri RM, Ip JH. Amiodarone or an implantable cardioverter-defibrillator for congestive heart failure. *N Engl J Med* 2005;352:225-37.
- 7- Kadish A, Dyer A, Daubert JP, Quigg R, Estes M, Anderson KP, Calkins H, Hoch D, Goldberger J, Shalaby A, Sanders WE, Schaechter A, Levine JH. Prophylactic defibrillator implantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2004;350:2151-8.

- 8- Køber L, Thune JJ, Nielsen JC, Haarbo J, Videbæk L, Korup E, Jensen G, Hildebrandt P, Steffensen FH, Bruun NE, Eiskjær H, Brandes A, Thøgersen AM, Gustafsson F, Egstrup K, Videbæk R, Hassager C, Svendsen JH, Høfsten DE, Torp-Pedersen C, Pehrson S. Defibrillator implantation in patients with nonischemic systolic heart failure. *N Engl J Med* 2016;375:1221-30.
- 9- Gulati A, Jabbour A, Ismail TF, Guha K, Khwara J, Raza S, Morarji K, Brown TD, Ismail NA, Dweck MR, Di Pietro E, Roughton M, Wage R, Daryani Y, O'Hanlon R, Sheppard MN, Alpendurada F, Lyon AR, Cook SA, Cowie MR, Assomull RG, Pennell DJ, Prasad SK. Association of fibrosis with mortality and sudden cardiac death in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *JAMA* 2013;309:896-908.
- 10- Hu DJ, Xu J, Du W, Zhang JX, Zhong M, Zhou YN. Cardiac magnetic resonance and galectin-3 level as predictors of prognostic outcomes for non-ischemic cardiomyopathy patients. *Int J Cardiovasc Imaging* 2016;32:1725-1733.
- 11- Leyva F, Zegard A, Acquaye E, Gubran C, Taylor R, Foley P, Umar F, Patel K, Panting J, Marshall H, Qiu T. Outcomes of cardiac resynchronization therapy with or without defibrillation in patients with nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:1216-27.
- 12- Nazarian S, Bluemke DA, Lardo AC, Zviman MM, Watkins SP, Dickfeld TL, Meininger GR, Roguin A, Calkins H, Tomaselli GF, Weiss RG, Berger RD, Lima JAC, Halperin HR. Magnetic resonance assessment of the substrate for inducible ventricular tachycardia in nonischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:2821-2825.
- 13- Leong DP, Madsen PL, Selvanayagam JB. Non-invasive evaluation of myocardial fibrosis: implication for the clinician. *Heart* 2010;96:2016-2024.
- 14- De Boer RA, Yu L, Van Veldhuisen DJ. Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2010;7:1-8.
- 15- Van Vark LC, Lesman-Leegte I, Baart SJ, Postmus D, Pinto YM, De Boer RA, Asselbergs FW, Wajon EMCJ, Orsel JG, Boersma E, Hillege HL, Akkerhuis KM.

Prognostic value of serial galectin-3 measurements in patients with acute heart failure. *JAHA* 2017;6:1-12.

16- Francia P, Adduci C, Semprini L, Borro M, Ricotta A, Sensini I, Santini D, Caprinuzzi M, Balla C, Simmaco M, Volpe M. Osteopontin and galectin-3 predict the risk of ventricular tachycardia and fibrillation in heart failure patients with implantable defibrillators. *J CardiovascElectrophysiol* 2014;25:609-616.

17- Pimentel M, Zimmerman A, Chemello D, Giaretta V, Andrades M, Silvello D, Zimmerman L, Rohde LE. Predictors of serious arrhythmic events in patients with nonischemic heart failure. *J Interv Card Electrophysiol* 2017;48:131-139.

18- Lok DJA, Van Der Meer P, Bruggink PW, de la Porte A, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. *Clin Res Cardiol* 2010;99:323-328.

19- Chen A, Hou W, Zhang Y, Chen Y, He B. Prognostic value of serum galectin-3 in patients with heart failure: A meta-analysis. *Int J Cardiol* 2015;182:168-170.

20- Binas D, Daniel H, Richter A, Ruppert V, Schlüter KD, Schieffer V, Pankuweit S. The prognostic value of sST2 and galectin-3 considering different aetiologies in non-ischaemic heart failure. *Open Heart* 2018;5:e000750.

21- Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2006;1760:616–35.

22- Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Poirier F, Russo FP, Iredale JP, Haslett C, Simpson KJ, Sethi T. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci United States Am* 2006;103:5060–5.

23- Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P, López-Andrés N. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33 67–75.

24- Pawlicki L, Szadkowska I, Wlazeł RN, Migąła M, Szadkowski K, Zielińska M, Paradowski M, Lucjan. The association between galectin-3 and clinical parameters in patients with first acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary angioplasty. Assoc. between galectin-3 Clin. parameters patients with first acute Myocard. Infarct. Treat. with Prim. percutaneous Coron. angioplasty. 2013;20: 577–82.

25- Selcoki Y, Aydin HI, Celik TH, Isleyen A, Erayman A, Demircelik MB, Demirin H, Kosus A, Eryonucu B. Galectin-3: A biochemical marker to detect paroxysmal atrial fibrillation? Clin Investig Med 2016;39:197–203.

26- Gurses KM, Yalcin MU, Kocyigit D, Canpinar H, Banu E, Yorgun H, Sahiner ML Kaya E, Ozer N, Tokgozoglu L, Oto MA, Guc D, Aytemir K. Effects of Persistent Atrial Fibrillation on Serum Galectin-3 Levels. *Am J Cardiol* 2017;115:647–51

27- Gawor M, Śpiewak M, Janas J, Kożuch K, Wróbel A, Mazurkiewicz L, Baranowski R, Marczak M, Grzybowski J. The usefulness of soluble ST2 and galectin-3 as novel biomarkers for better risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy. *Kardiol Pol* 2017;75:997-1004.

Table 1. Clinical characteristics of the population according to galectin-3 levels

	All patients (n=148)	Upper Quartile GAL-3 >22.5 ng/mL (n=36)	Lower Quartiles GAL-3 ≤ 22.5 ng/mL (n=112)	<i>P value</i>
Age (years)	54.8±12.7	63±9.3	52.2±12.6	<0.001
Male gender (%)	88 (59.5)	20 (55.6)	68 (61.3)	0.54
NYHA Class (%)				
I	63 (42.6)	11 (30.6)	51 (46)	0.12
II	59 (39.9)	15 (41.7)	44 (40)	
III	26 (17.6)	10 (28.8)	16 (14.4)	
IV	0	0 (0)	0 (0)	
Etiology (%)				
Idiopathic	67 (45.3)	13 (36.1)	54 (48.6)	0.38
Hypertensive	25 (16.9)	7 (19.4)	18 (16.2)	
Alcohol	18 (12.2)	4 (11.1)	14 (12.6)	
Chagas Disease	7 (4.7)	3 (8.3)	4 (3.6)	
Valvular	4 (2.7)	2 (5.6)	2 (1.8)	
Other	27 (18.2)	7 (19.5)	19 (17.1)	
Physical Exam				
Systolic Pressure (mmHg)	119.3±21.6	122.6±22.5	118.1±21.3	0.28
Diastolic Pressure (mmHg)	74.7±12.7	74.6±13	74.8±12.8	0.95
Laboratory Exam				
Hemoglobin (g/dL)	13.4±1.6	12.6±1.9	13.6±1.4	0.008
Lymphocytes (/mm ³)	2099.2±848	1825±787	2193±852	0.02
Creatinine (mg/dL)	1.1±0.73	1.6±1.1	1.0±0.4	0.002
Sodium (mEq/L)	140±2.8	140±2.9	140±2.8	0.865
Potassium (mEq/L)	4.6±0.4	4.6±0.4	4.6±0.3	0.827
Uric Acid (mg/dL)	7.5±2.2	8.6±2.4	7.1±2.1	<0.001
Glucose (mg/dL)	118±49.6	117.5±40.3	118.4±52.6	0.923
Total Cholesterol(mg/dL)	180.6±42.6	188.4±42.6	177.3±41	0.165
LDL(mg/dL)	104.7±37.2	110.5±37.6	102.3±36.8	0.267
Galectin-3 (ng/mL)	19±9.4	31.6±10.7	14.9±10.7	<0.001

Echocardiography

LV EF (%)	27.4±7.5	27.3±7.6	27.4±7.5	0.97
Left Atrium (mm)	47.3±6.6	48.7±7	46.9±6.4	0.15
LV diastolic diameter (mm)	67.5±10.2	65.3±7	68.2±11	0.13
LV Systolic diameter (mm)	58.7±10.1	56.6±8.5	59.4±10.6	0.15

EKG

Atrial fibrillation	22 (14.9)	8 (22)	14 (12.6)	0.16
LBBB	60 (40.8)	18 (50)	42 (37.8)	0.46

24 hour Holter Monitoring

Non-sustained VT (%)	54 (36.5)	12 (33.3)	42 (38.5)	0.57
Non-sustained VT > 10 beats	11 (7.4)	1 (8.3)	9 (21.4)	0.54

Cardiopulmonar Test

Peak VO ₂ (mL/kg.min)	18±5.1	14.7±4.3	19±4.9	<0.001
VE/VCO ₂ slope	41.5±11.7	44.3±12.5	40.8±11.5	0.14
Periodic Ventilation (%)	26 (17.5)	3 (8.3)	23 (20.5)	0.14

EP Study (%)

No induction	129 (87.2)	34 (94.4)	94 (84.7)	0.10
Monomorphic SVT	10 (6.8)	0	10 (9)	
Polymorphic SVT	5 (3.4)	1 (2.8)	4 (3.6)	
Ventricular Fibrillation	3 (2)	0	3 (2.7)	
HV Interval (ms)	52.6±10.4	54.2±11.3	52.2±10.1	0.34

Medication

Beta-blocker (%)	144 (97.3)	36 (100)	107 (96.4)	0.57
ACEi or ARB (%)	144 (97.3)	32 (88.9)	111 (99.1)	0.003
Espironolactone (%)	103 (69.6)	21 (58.3)	82 (73.9)	0.07
Digoxin (%)	121 (81.8)	31 (86.1)	90 (81.1)	0.49
Antiarrhythmic (%)	8 (5.4)	1 (2.8)	7 (6.3)	0.41

Data expressed as mean ± standard deviation or absolute number (percentage)

LV: left ventricular; EF: ejection fraction; VT: ventricular tachycardia; VO₂: oxygen consumption; SVT: sustained ventricular tachycardia; ACEi: angiotensin converting enzyme; ARB: angiotensinogen receptor blocker; LBBB: left ventricular bundle branch block.

Table 2. Clinical outcomes according to galectin-1 levels

	All patients (n=148)	Higher Quartile GAL-3 >22.5ng/mL (n=36)	Lower Quartiles GAL-3 ≤ 22.5ng/mL (n=112)	<i>P</i> value
Primary Outcome (%)	26 (17.5)	7 (19.4)	19 (17)	0.73
Syncope (%)	5 (3.3)	0 (0)	5 (4.5)	0.44
ICD Therapy (%)	7 (4.7)	3 (8.3)	4 (3.6)	0.24
Sudden Death (%)	13 (8)	4 (11)	9 (8)	0.57
Sustained VT (%)	1 (0.7)	0 (0)	1 (0.9)	
Secondary Outcome (%)				
Cardiovascular Mortality(%)	10 (6.7)	5 (13.9)	5 (4.5)	0.05
Total Mortality (%)	30 (20.2)	13 (36.1)	17 (15.2)	0.007
HF hospitalization	81	50	31	<0.001

Data expressed as absolute number (percentage)

ICD- implantable cardiac-defibrillator; VT- ventricular tachycardia; HF- heart failure.

Table 3. Univariable analysis and Cox proportional hazard model for the primary outcome

	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Galectin-3 (for each 1 ng/mL)	1.003	0.97-1.04	0.877			
Galectin-3 > 22.5 ng/mL	1.13	0.47-2.7	0.787			
Atrial Fibrillation	1.86	0.75-4.6	0.182			
LVEF < 20%	0.69	0.21-2.3	0.691			
LVEDD >73mm	4.13	1.91-8.9	<0.001	3.70	1.69-8.1	0.001
Peak VO ₂ <14.2 ml/kg/min	1.69	0.75-3.9	0.203			
VE/VCO ₂ slope >48.4	2.32	1.05-5.1	0.037			
Exercise Periodic Breathing	3.37	1.52-7.4	0.030	2.67	1.19-6.0	0.017
HV interval > 59.5ms	2.23	1.01-4.9	0.047			
NSVT > 8 beats	3.27	1.11-9.7	0.030	3.47	1.15-10.5	0.027
Positive EPS	1.58	0.54-4.6	0.403			

LVEF - left ventricular ejection fraction; LVEDD - left ventricular end-diastolic diameter; Peak VO₂ - peak oxygen consumption; NSVT - non-sustained ventricular tachycardia; EPS - invasive electrophysiological study.

Table 4. Univariable analysis and Cox proportional hazard model for total mortality

	Univariable analysis			Multivariable analysis		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Galectin-3 (for each 1 ng/mL)	1.024	0.99-1.05	0.057			
Galectin-3 > 22.5ng/mL	2.20	1.07-4.5	0.033	3.69	1.7-8.19	0.001
Atrial Fibrillation	0.98	0.34-2.8	0.980			
LVEF (for each 1%)	0.96	0.91-1.01	0.098			
LVEF < 20%	1.40	0.57-3.4	0.461			
LVEDD >73mm	3.02	1.44-6.3	0.003	3.35	1.53-7.34	0.003
Peak VO ₂ (ml/kg/min)	0.92	0.86-0.997	0.042			
Peak VO ₂ <14.2ml/kg/min	1.20	0.53-2.7	0.656			
VE/VCO ₂ slope > 48.4	1.92	0.89-4.1	0.092			
Exercise Periodic Breathing	2.91	1.36-6.2	0.006	3.06	1.38-6.77	0.006
HV interval > 59.5ms	2.80	1.36-5.8	0.005	1.98	0.95-4.13	0.068
NSVT > 8 beats	3.31	1.26-8.7	0.015	3.95	1.45-10.73	0.007
Positive EPS	0.95	0.29-3.1	0.993			

LVEF - left ventricular ejection fraction; LVEDD - left ventricular end-diastolic diameter; Peak VO₂ - peak oxygen consumption; NSVT - non-sustained ventricular tachycardia; EPS - invasive electrophysiological study.

Table 5. Positive and negative predictive values according to risk factors

Primary Outcome (Arrhythmic Events)				
	All patients (n=148)	With Event (n=26)	PPV% (95%IC)	NPV% (95%CI)
LVEDD >73mm	36	13	36.1 (24.9-49)	88.3 (83.7-91.8)
EPB	26	10	38.4 (24.2-54.9)	86.8 (82.9-90)
NSVT >8 beats	11	4	36.3(15.2-64.4)	83.7 (81.2-85.9)
Absence of all three	90	8		91.1(85.4-94.8)
Secondary Outcome (Total Mortality)				
	All patients (n=148)	With Event (n=30)	PPV% (95%IC)	NPV% (95%CI)
Gal-3 >22.5ng/mL	36	13	36.1 (24.6-49.4)	84.8 (80.1-88.5)
LVEDD >73mm	36	12	33.3 (22.1-46.8)	83.9 (79.3-87.6)
EPB	26	10	38.4 (24.3-55.2)	83.6 (79.6-86.9)
NSVT >8 beats	11	5	45.5 (21.4-71.8)	81.4 (78.8-83.8)
HV interval >59.5ms	35	13	37.1 (25.3-50.7)	84.9 (80.3-88.6)
Absence of all five	55	2		96.3 (85.2-99.0)

Gal-3: galectin-3. LVEDD: left ventricle end-diastolic diameter; EPB: exercise periodic breathing; NSVT: non-sustained ventricular tachycardia.

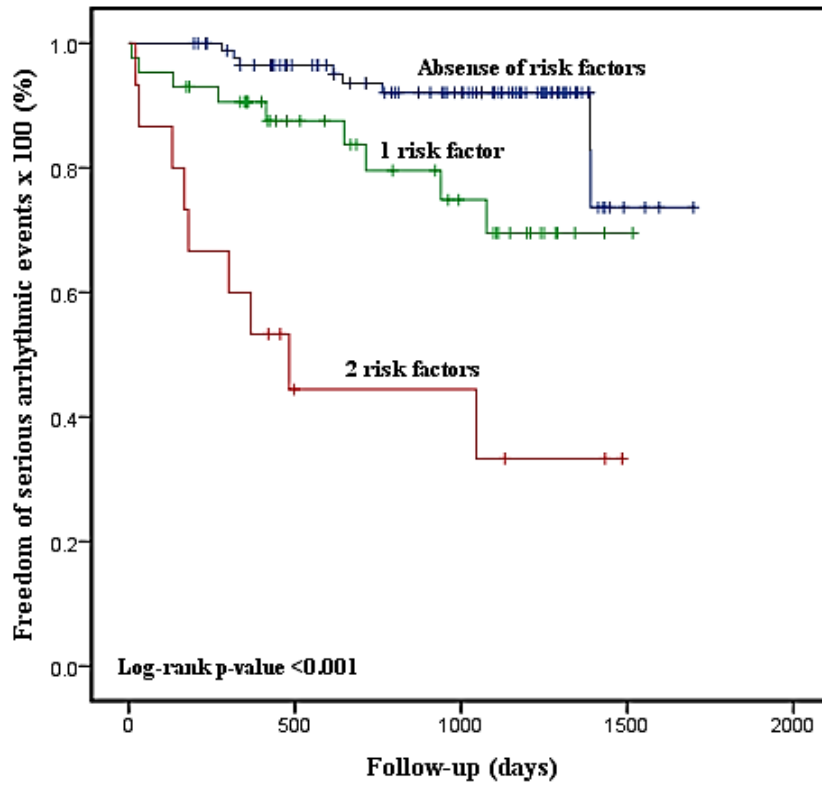


Fig.1 Kaplan-Meier graph demonstrating the survival free from the primary outcome (serious arrhythmic events) stratified by the number of risk factors.

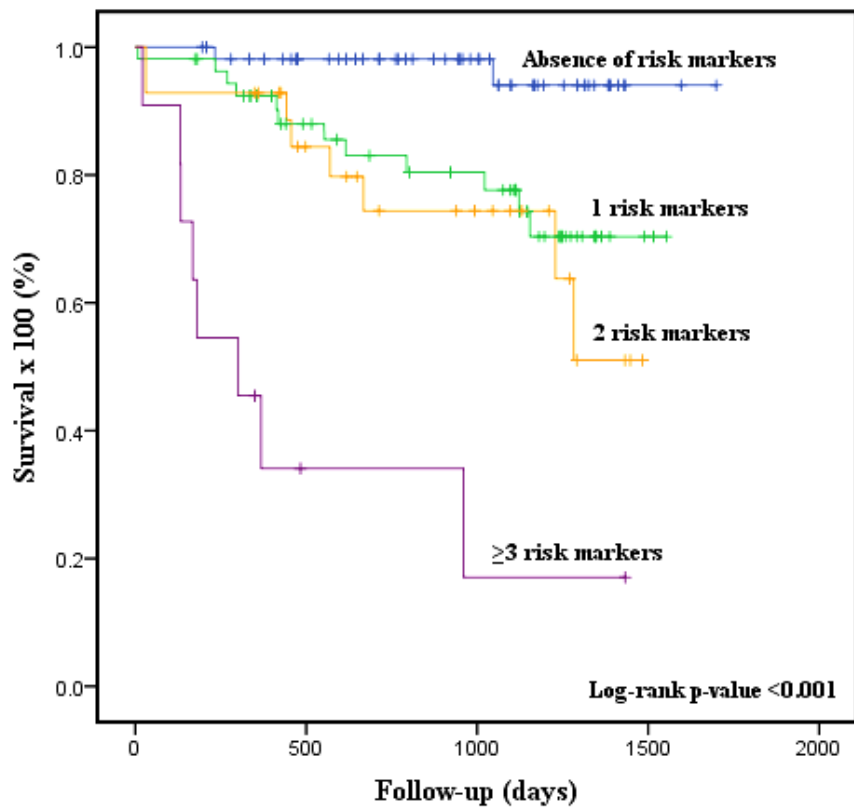


Fig 2. Kaplan-Meier graph demonstrating survival free from all-cause death stratified by the number of risk markers

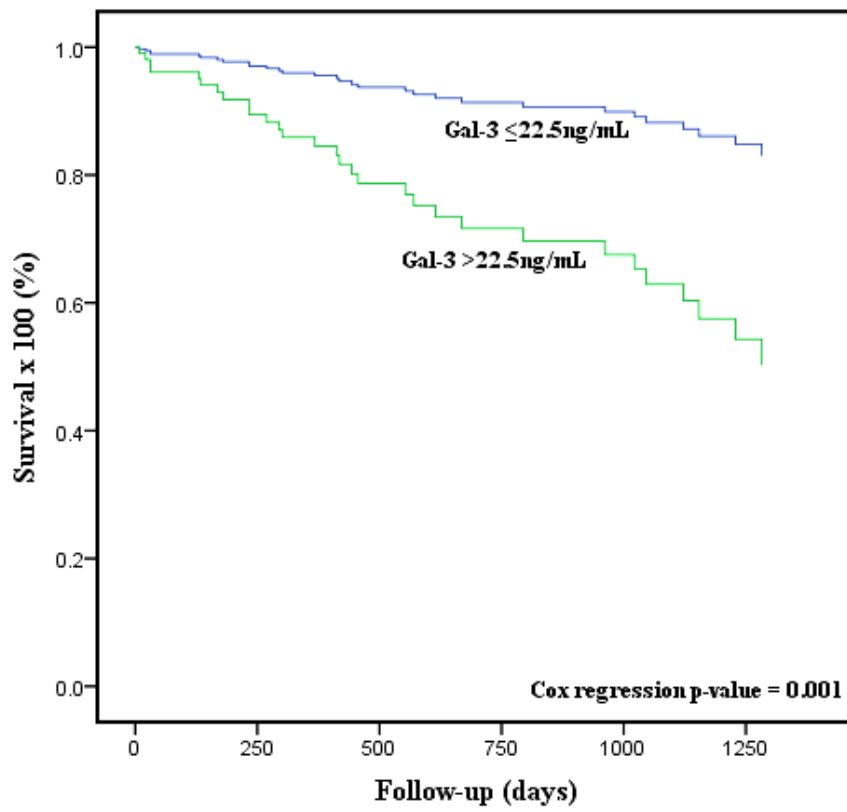


Fig 3. Cox regression survival graph stratified by galectin-3 levels and adjusted for LVEDD, EPB, NSVT >8 beats and HV interval >59.5ms.